

ZÁRÓJELENTÉS SZAKMAI BESZÁMOLÓ

Pályázat címe: A szívritmuszavarok és a myocardialis repolarizáció mechanizmusainak vizsgálata; antiaritmiás és proaritmiás gyógyszerhatások elemzése (NI 61902)

Vezető kutató: Prof. Dr. Varró András

(Szegedi Tudományegyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet)

Pályázat futamideje: 2006.02.01.-2009.01.31.

A projekt fő kutatási célja a miokardiális repolarizáció mechanizmusának és az ezzel összefüggésben levő antiaritmiás és proaritmiás gyógyszerhatások vizsgálata, illetve a mechanizmusok eddiginél pontosabb megértése volt.

A kísérletek 2006-ban technikai, illetve adminisztratív okok miatt ugyan jelentős késéssel indultak, de már viszonylag rövid idő elteltével eredmények születtek. Kutyákon, alloxan diabeteszes kísérletes modellen megállapítottuk, hogy a repolarizációs rezerv csökkent, amely a tranziens káliumáram (I_{to}) és lassú késői egyenirányító káliumáram amplitúdójának csökkenésével áll összefüggésben. Ez utóbbi celluláris elektrofiziológiai mérésekkel összhangban Western blot analízissel kimutattuk, hogy az I_{to} ioncsatornák alfa alegységét ($Kv4.3$), és az I_{Ks} ioncsatornák beta alegységét (Mink) képviselő proteinek mennyisége szignifikánsan kevesebb volt a diabeteszes kutyák szívében a kezeletlen kontroll csoporthoz képest (Lengyel és mtsai. *Cardiovasc. Res.* 2007; 73: 512-520, 2007). A repolarizációs rezerv fő komponenseinek alapjául szolgáló I_{Ks} áram (Jost és mtsai *Annals Noninvasive Electrocardiol* 12: 64-78, 2007) csökkenését tapasztaltuk alloxan diabeteszes nyúl kísérletekben is (Lengyel és mtsai *Acta Physiol (Scand)* 192: 359-369, 2008).

Mіндеzek az eredmények azt sugallják, hogy a diabetes mellitusban szenvedő betegek repolarizációs instabilitása megnövekedhet, amely hozzájárulhat az ezen betegeknél észlelt hirtelen szívhalál kockázat megnövekedéséhez. Jelenleg is folyó klinikai vizsgálatainkban és jövőbeli kísérletes terveinkben ezen kérdéskör vizsgálatát folytatni kívánjuk. Ezt megelőzően, de ezzel is összefüggésben megállapítottuk, és egy „Editorial” közleményben diszkutáltuk (Varró és Papp *Cardiovasc. Res.* 70: 404-406, 2006) a repolarizációs rezerv lehetséges szerepét hosszú QT szindrómában.

A proaritmiás gyógyszerhatások (melyek a repolarizációs rezerv csökkenésével kapcsolatosak) megfelelő predikciójának kidolgozásához új módszert fejlesztettünk ki,

amelyet részletesen a British Journal of Pharmacology-ban (Lengyel és mtsai Br. J. Pharmacol. 151: 941-951, 2007) publikáltunk. E munka keretében mi a repolarizációs rezerv csökkenését nem bonyolult műtéti eljárást követő remodelling segítségével, hanem az I_{Ks} ionáram farmakológiai gátlásával értük el. Ezután I_{Kr} gátló gyógyszer adását követően a Torsade de Pointes aritmia könnyen kiválthatóvá vált. A munka során kiderült az is, hogy a rövid távú repolarizációs variabilitás növekedése előnyösebb proaritmiás markernek bizonyult, mint az EKG QTc távolságának megnyúlása. Reményeink és jövőbeli terveink arra irányulnak, hogy ezt az eljárást klinikai vizsgálatokban és experimentális gyógyszerbiztonsági szűrésekben egyaránt kipróbáljuk. A téma és munkánk jelentőségét tükrözte az is, hogy e közleményünket a folyóirat szerkesztősége „Editorial”-ban ajánlotta az olvasók figyelmébe (Thomsen Br. J. Pharmacol. 151: 909-911, 2007). Megállapítottuk azt is, hogy az altatószereknek Torsade de Pointes aritmiát befolyásoló hatása van, amelyet figyelembe kell venni a repolarizációs rezerv gyengülését követő aritmiák vizsgálatakor is (Vincze és mtsai Br. J. Pharmacol. 153: 75-89, 2008). Az I_{Ks} ionáram mellett vizsgáltuk a befelé egyenirányító káliumáram (I_{K1}) szerepét is a repolarizációs rezerv létrehozásában. Ezekben a vizsgálatokban megállapítottuk, hogy az emberi szívizomban a kutyával ellentétben az I_{K1} káliumáramnak kisebb szerepe van a repolarizációs rezerv kialakításában, amelynek következtében a kutya és emberi szíven mérhető proaritmiás gyógyszerválaszok eltérőek lehetnek (Jost és mtsai Circulation 118: S342, 2008). E munkát kézirat formájában foglaltuk össze és az USA-beli Circulation Research folyóiratba küldtük be, és jelenleg a bírálók által megfogalmazott revíziós kérdések teljesítésén dolgozunk. A fordított frekvenciafüggő repolarizáció megnyúlás, amely egyes megbetegedéseknél, illetve gyógyhatások következtényeként tapasztalható, általános vélekedések szerint növeli a proaritmiás kockázatot. A British Journal of Pharmacology-ban megjelent munkánkban a hagyományos felfogástól eltérő új mechanizmust írtunk le a jelenség magyarázatául (Virág és mtsai Br. J. Pharmacol. 2009. online DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00116.x). E hipotézis szerint a fordított frekvenciafüggő repolarizáció megnyúlás („reverz rate dependency”) oka nem a gyógyszerek speciális kötődésével és szelektív gátló hatásaival, hanem az akciós potenciál jelformáira kifejtett sajátos hatásaival áll összefüggésben, azaz ez a jelenség elsősorban nem az egyes gyógyszerek tulajdonságaitól, hanem a szívizom elektrofiziológiai működésének intrinsic sajátosságaitól függ.

A kalciumfüggő káliumáramok vizsgálatát patkány és kutyaszív preparátumokon végeztük. Az irodalmi adatokkal ellentétben azonban saját kísérleteink cáfolni látszanak egy, a szív

repolarizációját markánsan befolyásoló kalciumfüggő apamin érzékeny káliumcsatorna szerepét. Ez utóbbi munkákból készült kéziratot a Journal of Molecular and Cellular Cardiology folyóiratba küldtük be 2008-ban és jelenleg a bírálók által felvetett kérdések megválaszolását végezzük, és a kéziratot legkésőbb 2009. április végén a fenti folyóirathoz visszaküldjük.

Az akciós potenciál modellezési feladatainkat a projektben szereplő Dr. Hála Ottó tragikus halála miatt (aki e terület kiváló ismerője volt) külföldi kooperációs partnerekkel folytattuk. Ennek során az Oxfordi Egyetem Élettani Intézetével közösen az I_{Kr} és I_{K1} káliumáramok szerepét modelleztük, amelynek eredményeit az Progress in Biophysics and Molecular Biology-ban (Fink és mtsai. Prog. Biophys. Mol. Biol. 96: 357-376, 2008) publikáltuk. Az említett, és más munkacsoportokkal közösen 2007. októberében egy EU-7-es konzorciális pályázatot nyújtottunk be akciós potenciál, illetve proaritmiás gyógyszerhatások előrejelzésének matematikai modellezéséről. E pályázat 2008. júliusától fut, futamideje 3 év (preDICT Computational prediction of drug cardiac toxicity (EU 7 grant ICT-2008-224381, preDICT) és jelenleg is ennek megvalósításán dolgozunk.

Az említett modellezési munkákon kívül USA-beli (Yoram Rudy professzor, Washington University, St. Louis) partnerekkel kooperációs munkát folytattunk egy kísérletes alapokon nyugvó humán kamrai akciós potenciál modell kidolgozására, amely munka összefoglalására, és vélhetően élvonalbeli USA folyóiratba beküldésére a jövő év (2010) elején fog sor kerülni.

Korábban megállapítottuk, hogy a szívben a Na^+/Ca^{2+} cseremechanizmus következtében fellépő ionáram (I_{NCX}) gátlása új típusú antiaritmiás hatás megnyilvánulása lehet. (Nagy és mtsai Br. J. Pharmacol. 143: 827-831, 2004) így az NCX gátlásának vizsgálata a jelen projekt egyik feladatát képviselte. Ezen vizsgálatok során megállapítottuk, hogy patkányszíveken az NCX specifikus gátlása után az intracelluláris Ca^{2+} tranziens és kontrakciós erő növekedése volt tapasztalható annak ellenére, hogy az L-típusú kalciumáram amplitúdója csökkent. A paradox jelenséget a sejtből történő kalcium kiáramlás csökkenése okozza, amelyet az NCX gátlás következményének gondolunk. A csökkent kalcium kiáramlás fokozza az L-típusú kalcium áram inaktivációját, és így következményesen magát a kalciumáramot is mintegy autoregulációs folyamatként szabályozza (Acsai és mtsai Eur. J. Pharmacol. 576: 1-6, 2007). Az NCX csereáram gátlásával kapcsolatos vizsgálataink további érdekes, és nehezen interpretálható eredményekhez vezettek. Kutya miocitákon az NCX gátlása - a patkányszíven észleltekkkel ellentétben - nem fokozta a Ca^{2+} tranziens amplitúdóját, amely egyrészt az alkalmazott gátlószer, a SEA-0400 mérsékelt kalciumcsatorna gátló hatásával, illetve a szer

intracelluláris Ca^{2+} függő NCX gátlásával lehet összefüggésben (Birinyi és mtsai *Cardiovasc. Res.* 78: 476-484, 2008). Hasonlóképpen azt tapasztaltuk, hogy az NCX gátló SEA-0400 nyúlszíven - ellentétben a patkányszíven tapasztaltakkal - nem fejtett ki pozitív inotrop hatást, amelyet elsősorban a kamrai akciós potenciál jelforma különbségeknek tulajdoníthatunk (Farkas és mtsai *Br. J. Pharmacol.* 154: 93-104, 2008).

Külföldi kooperációs partnerekkel közösen megvizsgáltuk a különféle transzmembrán ioncsatornák egészséges humán szívizomban történő expresszióját. A munka során kiderült, hogy az emberi szívizom transzmembrán ioncsatornák 96 génjét vizsgálva jelentős regionális különbségek tapasztalhatók az egyes szívrészek (endokardium, epikardium, jobb és bal kamra), illetve szövetfélések (pitvar, kamra, Purkinje rost) között. Ezek a különbségek nagymértékben hasonlítanak arra, amelyet korábban emlős szívpreparátumokban már leírtak. Érdekes, új és más kísérleti állatoktól eltérő adatokat találtunk az I_{to} áramot alkotó csatornagének (Kv 4.3, Kv 1.4, Kv 1.7, Kv 3.4, Kv 4.2), illetve I_{K1} áramot alkotó csatornagének (Kir 2.1, 2.2, 2.3, TASK1, TWIK) expresszióját illetően, amely további kísérletek és vizsgálatok kiindulópontjául szolgál (Gaborit N. és mtsai *J. Physiol.* 582: 675-693, 2007).

Szintén külföldi partnerekkel közösen megvizsgáltuk a Brugada szindrómás betegek szív ioncsatorna transzkripciós profilját. E vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a Brugada szindrómás betegekben Nav 1.5, Kv 4.3 és Kir 3.4 gének gyengébben, míg a Nav 2.1 és TWIK1 gének erősebben expresszálódnak, mint az egészséges populációban. E megfigyelésnek mind a betegség diagnózisában, mind a kezelési stratégiákban jelentősége lehet (Gaborit és mtsai *Eur. Heart J.* 30: 487-496, 2009).

A projektben célul tűztük ki a prekondicionálás lehetséges hatásmechanizmusainak további vizsgálatait is. Ennek keretében megállapítottuk, hogy az endogén peroxynitrit antiaritmiás hatású, amely hatás azonban nem a mitokondriális ATP-függő káliumcsatornák befolyásolásával áll összefüggésben (Kiss és mtsai *Br. J. Pharmacol.* 155: 1015-1024, 2008).

Másik munkában azt találtuk, hogy a gap junction csatornák részleges záródása trigger szerepet játszik a prekondicionálás védőhatásában, ugyanakkor ha a gap junction csatornákat a prekondicionálás után gátoljuk, a védőhatás csökken (Papp és mtsai *Cardiovasc. Res.* 74: 396-405, 2007).

Görögországi kémikus és farmakológus partnerekkel végzett kooperációs munkánk során számos újonnan szintetizált antiaritmiás ill. antiiszkémiás vegyület hatásait vizsgáltuk meg

iszkémia/reperfúzió modellben. A vegyületek tervezésekor 6-Hydroxy-5,7,8-trimethyl-benzopyran és 5,7,8-trimethyl-1,4-benzoxazine származékokat módosítottunk úgy, hogy C4 és N4 terminálisoknál lidokain származékokat építettünk be a vegyületekbe. A kísérletek eredményei igazolták, hogy az új vegyületek valóban rendelkeznek a tervezett IB+III osztályú hatással, ugyanis hatékonyan csökkentették az iszkémia/reperfúzió alatt megjelenő aritmiákat. Ezek a vegyületek ígéretes proaritmiamentes „multichannel” gátló amiodaronszerű antiaritmiás szerek lehetnek (Koini és mtsai J. Med. Chem. Online DOI: 10.1021/jm801228h).